

甲南大学フロンティアサイエンス学部私立大学等経常費補助金特別補助

「大学間連携等による共同研究」

成果報告紀要

研究題目：様々な物質とペプチドの複合体におけるナノ・バイオへの応用展開の検討

共同研究期間（補助期間）：平成31年4月1日 ～ 令和4年3月31日

報告書作成年月日：令和4年9月30日

研究目的：近年、機能性中分子として注目されているペプチド（小タンパク質）を、さらに高機能化、多機能化させることを指向して、生体分子、無機化合物、有機小分子、高分子などと複合させた新規機能性複合体の創製を目的とする。また、これら複合体を用いたナノ分野やバイオ分野への応用展開の検討も行う。

研究概要：これまで分子単体では達成できなかったような高機能・多機能性の材料開発を目指し、無機化合物、有機小分子、高分子とペプチドを複合させた新規機能性複合体を創製する。その創製に際しては、近年、機能性中分子として注目されているペプチドを基に、ある機能を有するペプチドに、糖、核酸、酵素などの生体分子、有機合成小分子、合成高分子、無機化合物などをそれらと結合するペプチドリガンドを介してあるいは共有結合などで複合させることで、従来以上に高機能化、多機能化させた分子・複合体の創製をねらう。さらに、本研究で作製できた複合体を用いて、多段階触媒能を有する材料や、エレクトロニクス材料、特定疾病分子などを高度に検出できる素子、治療に役立つ薬剤などの開発につなげ、ナノ分野、バイオ分野への工学的な応用展開を検討する。

研究担当者：

赤松謙祐（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）

川上純司（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）

甲元一也（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
長濱宏治（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
中野修一（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
西方敬人（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
藤井敏司（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
松井 淳（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
三好大輔（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
村嶋貴之（甲南大学フロンティアサイエンス学部・教授）  
臼井健二（甲南大学フロンティアサイエンス学部・准教授）  
川内敬子（甲南大学フロンティアサイエンス学部・准教授）  
鶴岡孝章（甲南大学フロンティアサイエンス学部・准教授）  
高嶋洋平（甲南大学フロンティアサイエンス学部・講師）  
堤 浩（東京工業大学生命理工学院・准教授）

## 研究成果報告：

はじめに

多様な機能性ペプチド複合体の創製を目指すために研究期間内に、1) ペプチドに関する研究、2) ペプチド複合体に関する基礎的研究、3) 複合体として用いる分子に関する研究、4) 細胞研究を中心としたバイオへの応用に向けた準備研究、5) ペプチド複合体を用いた応用研究を行った。

### 1) ペプチドに関する研究

まず、アミロイドペプチドの作製法の構築についての研究を行った。HPLC 精製直前まで樹脂上に保持し、精製時に簡便な方法による樹脂からの切り出し、凝集を抑えたまま精製する手法を開発した。アミロイドペプチドは凝集しやすく精製が困難であるために合成が難しいペプチドとされているが本法により簡便に収率を上げることが可能となった。以上の研究成果は MDPI Processes 誌にて 2020 年 4 月に、表紙採用され、最注目論文として発行された[1]。これを基に、 $\beta$  シートを取り得る、アミロイド性の高いペプチド配列を見いだすべく、60 程度程度のミニペプチドライブラリを構築し、各種測定と、特別研究員武川公博士の協力も仰ぎ、統計解析を行った。その結果、ある凝集性ペプチド配列から 1 残基 N 末端に付加させたアミノ酸の性質によって、 $\beta$  シート性やアミロイド性の変化に、ある規則性が見出せる知見が得られた。この知見が正しいことを、非天然の人工アミノ酸の付加において、あらかじめ  $\beta$  シート性やアミロイド性の予測を行い、実際そのような性質を持つかの検証を行い、示した[2]。また、これら解析で見出された有力配列を用いた医工学材料への応用研究も進めている。

アミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )凝集促進ペプチド(AFPP)を用いた、血漿中の A $\beta$  を迅速・高感度・安価に定量できるようなデバイスの開発を目指して新規 A $\beta$  検出法の開発にも取り組んだ。インピーダンス測定を用いた電極の評価、および定量の可能性について検討を行った。その結果、A $\beta$  の凝集条件を工

夫することにより、同じ AFPP 修飾電極を用いても、見かけ上の感度を向上させることができた。現在のところ、 $A\beta$  濃度が 5~1000 pM の範囲で良好な応答が得られ、検出限界も 0.7 pM と、目標とする血漿中  $A\beta$  濃度を測定できるところまで到達することができた。次に、血漿中の  $A\beta$  の測定を試みた。その結果、0.75 nM 以上の濃度範囲ではほぼ定量的に  $A\beta$  を観測できたが、それ以下の濃度では、血漿中の夾雑物質（おそらく含まれている様々なタンパク質）によって影響を受け、回収率が著しく低下することが分かった[3]。今後、これらの夾雑物質の影響を排除するための検討を行う予定である。

Three Helix Bundle 構造を有する人工金属タンパク質と一酸化窒素 (NO) との反応性の検討を行った。Helix 部位のペプチド長、すなわち Bundle 部位の疎水性相互作用が、NO との反応性を制御していることの直接的な証拠を得るために、15、19、22、26 残基のペプチド長を有する人工タンパク質を合成し、NO との反応性を調べたところ、予想通り、ペプチド長が延びるにつれて NO との反応性は低下することが分かった。また、これらのバンドルの安定性をグアニジン変性下で評価したところ、ヘリックス 1 ターンあたり約 -2.7 kcal/mol であり、ヘリックス部位の安定性が Fe-NO 結合エネルギーよりも上回ると、Fe-NO の反応性が著しく低下することを定量的に明らかにした。さらに Three Helix Bundle 構造を有する人工金属タンパク質の構築については、従来から用いているアミノ酸配列のうち Bundle 内部に向けたアミノ酸を別のアミノ酸に置換した際の Bundle 構造の安定性を検討した。NO の結合による Bundle 構造の崩壊を見たところ、アミノ酸側鎖の疎水性及びヘリックス形成性の違いによる反応性の違いが観測できた。これらの結果からも、従来提案している通り、バンドル構造の安定性が NO との反応性を制御していることが示唆された。

また、アミド結合形成反応についての研究も行っている。ニトリルをアミドに加水分解する反応を触媒するニトリルヒドラーターゼ (NHase) は、生成物の有用性、特異な配位環境が金属イオンに与える影響などから注目を集めている金属酵素である。これまで、NHase と同様の N2S3 型の配位形態をもつコバルト型モデル錯体を合成し、その触媒活性などを調べてきた。これまでの研究で課題となってきた合成した錯体の二量体化を防ぐために、配位子の原料として用いる 1-amino-2-methyl-2-propanethiol の合成を進めるとともに、ベンゼン環を配位子内を含む新しい配位子をもつモデル錯体の合成を行った。ベンゼン環を含む配位子については、従来よりも高収率で合成できるようになった。

さらに、マイクロ波による各種生命現象への影響[4]の詳細解析に関する研究について研究期間内にペプチドを題材に遂行している[5]。細胞導入ペプチドやミトコンドリア移行シグナルペプチドにおける細胞送達現象への電磁波影響の調査を行い、細胞導入現象においては電磁波の影響により促進される結果を見いだしている。現在、これら研究をまとめ論文作成中である。本研究は医療分野への応用展開が期待できる。

## 2) ペプチド複合体に関する基礎的研究

研究期間を通して、脂肪酸と脂質とペプチド・タンパク質、核酸とペプチドとの非共有結合による複合体に関する研究を行った。

まず、脂肪酸とタンパク質（ポリペプチド）に関する研究であるが、脂肪酸結合タンパク質

(FABP) のリガンド選択性についての研究を行った。以前から、サーマルシフトアッセイを用いて FABP3・FABP5・FABP7 に結合する脂肪酸の探索を行ってきた。本研究期間では、これまで未検討だった脂肪酸を新たに加え、様々な化学構造の脂肪酸（鎖長の違い、二重結合の位置と数の違い）に対してハイスループットスクリーニングを実施し、各 FABP の脂肪酸選択性の再検討を行った。

次に、脂質膜とペプチドとの相互作用によるペプチド複合体研究も行っている。本研究は東京農工大学川野竜司教授、横浜国大川村出准教授との共同研究である。β ストランドペプチドを膜上で複合させてバレル構造を構築しナノポアを作製する研究を行った。具体的には、農工大ではペプチドの膜透過を電流で測定できるデバイスを用いた計測、横国大では分子シミュレーションと NMR 解析、こちらではペプチドの合成および物理化学的性質を種々の測定装置で解析することで、膜上でのナノポア形成を証明した。本研究は *Nature Nanotechnology* 誌で公開された[6]。主要論文ではないものの、甲南大グループのペプチド合成、提供が無ければ、そもそもの研究が不可能であった。さらに本ペプチドは非常に合成が困難な配列であり、このペプチドを高純度で作上げたことも、本誌に採択された一因であったことが論文査読者の合成に関する評価、関心からもうかがえ、ペプチド合成分野では世界でも有数のラボであることをアピールできる良い機会となった。

また、近年の細胞生物学分野で最も注目を集める相分離についても研究を進めている。研究期間では、モデル核酸とモデルペプチドを用いて相分離を引き起こすことが可能な大変シンプルなモデル系を構築することができた[7-9]。本系は相分離の最小モデルシステムとして有用であると考えている。このモデルシステムを用いて相分離現象を合目的的に制御可能な低分子化合物の同定もできつつある。また、神経変性疾患とがんのカギとなるタンパク質と核酸が相分離で作用している可能性も見出された。上述の初報が発表できれば、論文作成が進むと期待している。また、今後注力する予定である、相分離現象とエピジェネティック修飾の相関についても、興味深い結果が得られつつある。

さらに、生体カチオン・ペプチド・タンパク質が DNA 構造に与える研究も行っている。研究期間も含めここ数年、DNA 及び RNA の非標準構造に対するカチオン性物質の影響を調べており[10-12]、研究期間中にはグアニン四重鎖構造に対するオリゴペプチドや塩基性タンパク質の影響について検討を進めた。具体的には、塩基性タンパク質とオリゴペプチドが DNA 二重鎖ループ構造の安定性に与える影響を解析するとともに、シトシンの連続配列が形成する DNA 四重鎖 (i-motif 構造) に与える影響も詳しく調べた。二重鎖構造に対してはシトクロームやヒストンもさらに検討し、これらの塩基性タンパク質は DNA のループサイズによって異なる影響を与えることを明らかにした。さらに、グアニン四重鎖結合タンパク質に見られる DNA 結合部位のアミノ酸配列を有する数種類のオリゴペプチドの影響を比較することで、静電相互作用の重要性を示すデータを得ることができた。I-motif 構造に対しては、塩基性タンパク質は安定化をもたらす一方で生体ポリアミンは不安定化をもたらす、二重鎖やグアニン四重鎖とは影響が異なることを明らかにした。

次に、ペプチドと核酸による新規二次構造を構築し、その構造形成能を外部環境・刺激によって変化させるスイッチシステムの確立を目指している。具体的にはグアニンに富む、ペプチド核酸 (PNA) 配列を有する人工スイッチペプチドを用いて、検討を行っている。また、本スイッチを応用して、生理的な機能制御システムの構築を目指している。2019 年度は、生理的機能制御システムの構築として、光切断官能基を有する光によって核酸構造をスイッチできる PNA 含有ペプチドを用

いて、タンパク質発現制御システムの構築を行い、論文執筆もほぼ完了している状態となっている。現在、高IFの雑誌への投稿を検討している段階である[13]。

### 3) 複合体として用いる分子、物質に関する研究

将来的にペプチドと複合化が期待できる、様々な分子・物質について研究を行った。

#### 3-1) 有機小分子

まず、有機小分子開発について述べる。機能性有機小分子の一つである凝集誘起発光 (AIE) 色素は、その特性から、近年バイオイメージングやバイオセンシングなど生命化学の領域で多用される機能性色素である。AIE 色素は凝集により強い蛍光を示す蛍光色素であり、また基本的に高い疎水性を示す化合物であるため、生理的環境下での利用が必須となるバイオセンシングなどでは、疎水性相互作用により自己凝集が起これば強いバックグラウンド蛍光が観測される。したがって、バイオセンシング等に使用するためには AIE 色素に水溶性を付与することが望まれる。そこで、カウンターイオンを持たず電荷分離している N-oxide 構造に着目し、数種の AIE 色素について合成し、THF-水混合溶媒の混合比を変化させながら DLS および蛍光測定を行ったところ、Pyridine N-oxide (4 位) が 4 つ導入された化合物は水溶液の状態でも蛍光を発せず、高い水溶性を持っていることがわかった。また、Pyridine N-oxide (4 位) と Pyridine N-oxide (3 位) を比較したところ、4 位のものに比べ、3 位のは蛍光が短波長シフトしていることが確認された。また、3 位のものの方が、水溶性が高い可能性が示唆された。そこで次に、3-ピリジル型の化合物の合成について検討し、TPE のフェニル基を 1 つあるいは 2 つ 3-ピリジル基およびその酸化体に変換した化合物を得た。これらの化合物の物性について検討したところ、水溶性は 1 置換体よりも 2 置換体の方が向上していたが、蛍光強度については対応する 4-ピリジルの化合物と比べてほとんど差がなかった。この点は、同等の蛍光強度を示す、あるいは水溶性の程度や蛍光量子収率が異なるなどの様々な要因が考えられるため、今後も継続して検討を行う。さらに別の検討として、AIE 色素を二分子連結した化合物 (便宜上 AIE ダイマーと呼ぶ) の合成についても検討した。これは、凝集の際に二箇所の AIE 色素部位が協奏的に相互作用することで蛍光増強効果が発揮されることを期待したものである。二分子の TPE を、エステルをリンカーとして *o*-キシレンに連結した形の AIE ダイマーの合成に成功した。この化合物は TPE そのものに比べて強い蛍光を発することが確認できたが、その理由については今後、検討していく。今回合成した化合物は親水性と蛍光強度を両立させた化合物であり、水中での使用が前提となる生命化学分野における AIE 色素の応用可能性を広げると考えられる[14-16]。

#### 3-2) 有機ポリマー

次に有機ポリマー開発について述べる。機能性有機構造体作製の一手法として、分子インプリンティング法が挙げられる。これらで作成できた機能性有機ポリマーとペプチドとの複合は、モノマー自体にペプチドを含有させる手法と、ゲスト分子にペプチドを用いる手法が考えられる。研究期間内では、主に、①イタコン酸を用いたニコチン認識高分子の合成、②分子インプリントポリマーにおける再構築法、および、③分子インプリントポリマーを用いたポリフェノールの固相抽出の確

立に取り組んだ[17-20]。①では、分子インプリンティング法においてイタコン酸 (IT) はメタクリル酸とならんでよく使用されるモノマーであり、ニコチン等、水素結合受容部位を複数有する分子に対して高いインプリント効果を示すことを見出している。研究期間内ではポリマーのバッチ結合テストを行い、重合容器内の場所別に親和性と結合部位数を見積もった結果、相互作用点の数よりも、架橋度の高さの方が大きな影響をもつことが示唆された。このような極端に高い架橋度をもつ高親和性ポリマーは、単に架橋剤添加量を増やすだけでは得ることができず (標的分子とモノマーの相対的濃度が下がるため)、重合場所に着目する分子インプリンティング法は、新しい分離分析材料の合成法として期待される。②分子インプリントポリマーにおける再構築法では、分子インプリンティングによる含金属ポルフィリンポリマーの合成を応用することにより、テーラーメイド触媒の合成を目指している。金属ポルフィリンをモノマーとした分子インプリンティングで触媒を製作する場合、分子インプリント後に金属を置換する必要性が考えられる。これまで、中心金属だけをポリマーから抽出除去し、再度、異なる金属を配位させることを検討したが、抽出および導入の効率が低かったため、ポルフィリンユニットを交換することを目指し、そのために、金属ポルフィリンを非共有結合的にポリマー内に固定化することを中心に検討を行った。③ポリフェノールの固相抽出では、鉄ポルフィリン型モノマーがケルセチンを認識する分子インプリントポリマーの合成に適していることを見出した。次に、実応用を目指し、このケルセチンインプリントポリマーを固相抽出の固定相に応用し、タマネギ外皮からケルセチンを抽出・単離することを行った。さらに、合成条件の見直しを行い、選択性を改善させることを検討した。より安定な配位結合形成が期待できるクロロホルム中にて、このケルセチンインプリントポリマーの合成を行った結果、保持能力の有意な向上が見られ、鉄ポルフィリン型ポリマーは水系溶離液中でもケルセチンを保持できることが明らかとなった。この結果は、将来ケルセチンインプリントポリマーを用いて食品廃棄物等からケルセチンを抽出する際、試料中の水分量の多少に柔軟に対応できることを示唆しており、固相抽出材料としての応用が期待できる。さらに、ケルセチンインプリントポリマーを用いて、ケルセチンと構造が類似するポリフェノール化合物、特にアントシアニン類を標的として捕捉することが可能か否か、検討を行った。高価なシアニジンの構造類似物であるケルセチンをダミーテンプレートとすることでシアニジンを認識するポリマーが得ることを目的として研究を行った。その結果、シアニジンはケルセチンよりも長く保持され、しかもアントシアニン類の中でもフェノール性ヒドロキシ基の数や位置がケルセチンと同じであるシアニジンが最も長く保持されることがわかった。このような、アントシアニンに対するケルセチンのダミーテンプレート効果は、鉄ポルフィリン型モノマー特有のものであることが示唆された[21]。

さらに有機ポリマーを基本とするゲルについての研究も行った。まず、①核移行性ナノゲルによる細胞核 DDS 研究においては、これまで開発してきた自発的に細胞核内へ移行するゲル状ナノ粒子 (核ナノトランスポーター) の新規展開として、正常細胞の核内に蓄積した抗がん剤ドキシソルビシンを核外に排出するシステムの開発に取り組んだ。核ナノトランスポーターはドキシソルビシンによる細胞死から筋衛星細胞をレスキューしたことが示された。つまり、核ナノトランスポーターは上記の新規アイデアを実現可能な基盤材料となることが実証できた[22-24]。次に従来のフェニルアラニンエチルエステル修飾ヘパリンナノゲルでは、核移行させるためにエレクトロポレーションにより細胞内に送達する必要があった。本研究期間ではこの課題の解決を目指し、ナノゲルに自発的な

細胞特込み能およびエンドソーム脱出能を付与することに取り組んだ。様々な分子設計を検討した結果、主鎖を負電荷多糖ヘパリンから中性多糖デキストランに変更したフェニルアラニンエチルエステル修飾デキストランとヒスチジンエチルエステル修飾デキストランの自己組織化により形成する混合ナノゲルでは、自発的な細胞取り込み後にエンドソームを脱出し、一部で核移行を示すことを見出し、目的が達成された[25]。次に、フェニルアラニンエチルエステル/ヒスチジンエチルエステル修飾率および混合比率の最適化により、最大の核移行性を示すナノゲルを取得した。これを受けて、細胞核内に機能性物質を送達できるか検証した。今後も検証を続け、核内物質送達および送達物質による細胞応答制御のデータをまとめて、論文投稿する。さらに、②生体の投与部位に存在するタンパク質や糖鎖などにより成分置換されるゲル（PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲル）を用いて、皮膚再生材料の開発を行った。これまでは健常なマウスを用いて再生成果を確認したが、将来的に臨床応用を視野に入れ、研究期間では基礎疾患をもつモデルマウスとして、糖尿病マウスを用いてゲルの皮膚再生効果を検証した。PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルを糖尿病モデルマウスの皮膚損傷部位に塗布すると、市販の皮膚再建材料（TERDERMIS®）と比べて著しく高い皮膚再生効果を示した。また、複合ゲルを塗布した組織にはまったく炎症反応が見られず、複合ゲルの優れた生体適合性が示された。以上より、複合ゲルは高い応用可能性をもつことが示された[26]。また別に、PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルに DFO および血管内皮細胞を担持して生体に移植すると、血管新生が効果的に起こることを見出し、組織再生効果を著しく向上させることを発見した。この内容について論文を公開した[27]。さらに、酵素β-ガラクトシダーゼを担持した複合ゲルが、生体内で抗がん剤を産生する工場として利用できることを見出した。具体的にこのシステムでは、β-ガラクトシダーゼを担持した複合ゲルをがん周辺局所に投与し、次いでβ-ガラクトシダーゼの酵素反応を受けて活性化される抗がん剤プロドラッグを投与すると、ゲル内でプロドラッグが抗がん剤に変換され、抗がん剤がゲルからがん周辺に長期的に徐放され、全身性の副作用なしで効果的な抗がん活性を示す。この成果について論文を公開した[28]。また、③細胞ゲルの応用展開として、骨格筋再生への応用について検討した。研究期間内で、北海道大学整形外科の医師チームと共同研究を開始し、ウサギを用いた再生効果の検証を開始している。また、細胞ゲルの、組織再生材料としての特長を明確にすることを目的に、研究を実施した。その結果、筋芽細胞をアルギン酸で化学架橋したゲルを大腿筋損傷マウスに移植すると、筋芽細胞を物理的に内包したアルギン酸ゲル移植と比べて、筋組織再生効果が有意に向上することを見出し、この発見を学術論文として発表した[29]。また、細胞ゲルによる再生促進メカニズムのひとつは、筋組織の力学負荷がゲルネットワークを通じて細胞に伝達することで筋分化および筋組織化が促進されることであると見出したため、論文作成に必要なデータ取得を進めた。加えて、筋芽細胞ゲル表面の細胞間で形成する接着機構を利用することで、細胞ゲル全体にバルクの自己修復機能を付与できることを見出したため、論文にまとめた[30]。さらに、骨格筋をモデルとして用いて、細胞ゲルが高い組織再生効果を示すメカニズムの解明を目指して研究を実施した。その結果、骨格筋組織で発生する動的な力学刺激を細胞ゲルのアルギン酸ゲルネットワークが受容し、次いで共有結合で連結した細胞に伝えることで、組織の力学刺激が細胞に対して高効率に伝わり、メカノトランスデューサーを介して転写反応が活性化されることで増殖・分化・組織化が促進され、組織再生が促進される仕組みを解明した。

### 3-3) 糖

糖鎖も、ペプチドとの複合体形成に有力である。多糖  $\beta$ -1,3-グルカンの機能を利用した機能性食品・化粧品、医薬品への展開研究において、平成 26 年度に見出した renature- $\beta$ -1,3-1,6-グルカン法 (r-グルカン法) の実用性について、企業との共同研究を通じて、製造方法に関する条件精査、可溶化する難水溶性物質の適応性の観点から検討を進めてきた。研究期間では、r-グルカンに包接された物質の機能性の評価を行った[31-35]。これまでの研究では、r-グルカンに対して難水溶性物質を混合して形成された包接複合体の包接特性、包接ゲストの放出特性などを中心に研究を進めてきたが、取り込まれたゲスト分子の機能性については検討がされてこなかった。そこで、ゲスト分子として、抗菌物質と抗酸化物質の 2 種類を選び、r-グルカンのそれらの物質に対する包接特性、並びに、包接複合体の機能性について評価を行った。抗菌物質に関しては、構造が複雑な種々の抗生物質も r-グルカンに包接されることが明らかとなった。さらに水溶性の向上に伴って低濃度でも大きな阻止円が形成されるなど、従来の包接可溶化剤と比較して新しい機能も見つかりつつある。抗酸化物質に関しては、r-グルカンに抗酸化物質が包接され、活性酸素種に応答する興味深い放出挙動が確認された。その効果と同じホスト分子となるシクロデキストリンと比較したところ、シクロデキストリンでは包接によって、多くの抗酸化物質で、活性酸素種との反応性が低下することが明らかとなった。一方、r-グルカンでは包接されないものよりも抗酸化活性が高いことが明らかとなった。シクロデキストリンでは抗酸化物質の包接形態が活性酸素種との反応性に影響を及ぼすことがわかっており、今後、これまでに明らかとなっていなかった包接形態に関する知見やゲスト分子の形状とキャビティ内でのパッキングなどの知見を得ていくことを目指す予定である。

### 3-4) 核酸

核酸においても、2)でも PNA (ペプチド核酸) を用いたペプチド研究に示されるように、有力な複合体構成要素となる。

まず、①核酸医薬の機能向上を目的とした分子設計研究として、2'酸素と 4'炭素が架橋された 2',4' 架橋型核酸 (BNA/LNA, ENA) について、DNA への導入が RNA/DNA 二重鎖形成に与える影響の定量を継続した。BNA/LNA に関しては、デュシエンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬モデル系で、強すぎる相互作用が治療効果を低下させるという問題の解決を試みた。まずこの治療効果の減少が何に起因するかを調べ、アンチセンス鎖同士の相互作用により pre-mRNA に結合可能なアンチセンス鎖の実効濃度が減少していることが問題であることを明らかにした。そこで次に治療効果減少の原因となる自己構造形成を抑制する目的でグアニンをヒポキサンチンに置換した修飾核酸を設計し、エキソンスキッピング活性の向上に成功した[36]。ENA に関しては、これまでチミン型の ENA または BNA/LNA で観測された安定化と同程度かそれ以上であることが確認された。また、ENA-G の複数導入による二重鎖の安定化効果はエネルギー的に相加性がある可能性を示すことができた[37]。また、これまで、2',4' 架橋型核酸を含む DNA 鎖を核酸医薬として用いる場合、37°C での安定性が重要であることから、一般的に二重鎖の融解温度で評価されてきた mRNA 結合能を  $\Delta G^{\circ}37$  で定量化することを試み、パラメータ化してきた。しかし、カロリーメーターで報告されている  $\Delta H^{\circ}$  の温度依存性は無視できないほど大きく、解析結果の重要性が高い安定な核酸医薬品候補ほど計算によって求めた  $\Delta G^{\circ}37$  が真の値からずれていることが懸念された。これを検証するため、



UV 融解曲線のカーブフィッティングに  $\Delta C_p$  の項を導入した新たなプログラムを開発した。次に、BNA/LNA/ENA について、トリプレットの安定性に関する塩基配列依存性を検討した。その結果、トリプレットの安定性には塩基配列依存性が認められた。また、LNA を含むトリプレットと ENA を含むトリプレットでは、同一塩基配列のトリプレットが非常に近い安定性であるものが多く、2',4' 架橋型核酸の安定性が共通のパラメータで予測できる可能性が示唆された[38]。②核酸医薬の機能予測を目的とした細胞内相互作用定量化ツール開発研究については、まず、核酸医薬と標的 pre-mRNA 間の相互作用の強さが細胞内機能と相関することが明らかになったため、細胞内に取り込まれた核酸医薬の挙動を定量解析するためのモデル系を構築した。Broccoli, Mango, Spinach の 3 種の蛍光アプタマーを改変し、アンチセンス鎖が pre-mRNA の標的配列に結合すると蛍光強度で定量的に応答するアプタセンサーの構築を行ったところ、蛍光強度の増大が核酸医薬の pre-mRNA 配列への結合量と相関することが確認された[39, 40]。次にこれを細胞内で発現させ、実際に核酸医薬の mRNA 結合を細胞内で定量解析することを試みた。蛍光アプタマーセンサーが細胞内で恒常発現するようセンサー配列を tRNA のアンチコドンループに導入したところ、核酸医薬との結合に伴う十分な蛍光増強が認められなかったパラメータ、tRNA 配列と蛍光アプタマーセンサーを繋ぐアダプター配列を種々変更し、効率よく蛍光増強する配列を探索しているが、未だ解決には至っていない。今後も検討を継続する予定である。

さらに、生体カチオン物質と RNA、DNA 構造に与える研究も行っている。まず、大きなサイズのアルキルアンモニウムイオンがアンチパラレル型からパラレル型への DNA 四重鎖の構造遷移を促すことを見出した。この知見に基づいて、四重鎖構造の遷移速度を CD スペクトル測定によって調べた。その結果、この構造遷移は数時間必要な遅い反応であることが明らかになった。また、一本鎖核酸とアルキルアンモニウムイオンの結合性評価も行った。核酸構造の熱安定性の測定結果に基づいて、大きなサイズのアルキルアンモニウムイオン (1 価カチオン) は核酸の一本鎖部位と選択的に結合することを提案してきた[41]。この結合性を確認するために、RNA-DNA キメラ核酸を用いた新たな検討を実施した。Mg<sup>2+</sup>によるリボヌクレオチド部位の加水分解速度の解析から、大きなサイズのアルキルアンモニウムイオンは核酸の一本鎖部位に結合することが示された。異なるタイプの有機カチオンについても検討を行い、有機カチオンの結合性を比較することができるデータが得られつつある[42]。さらに、キメラ核酸で得られた知見に基づいて、有機カチオンが RNA 鎖の分解抑制に利用できるかを調べるための実験系の構築に着手した。

また、核酸四重らせん構造リガンドの取得も行っている。これまでに当研究室で取得してきた蛍光プローブを利用して、核酸四重らせん構造に選択的に結合するリガンドの取得を進めている[43]。これまでに取得してきた蛍光プローブを利用して、核酸四重らせん構造に選択的に結合するリガンドの取得を進めている。約 2000 種類の化合物を含むライブラリを入手し、スクリーニングを進めた。細胞内での機能解析については、本学部内複数教員の共同で進めている。リガンドの構造展開についても開始し、京都大学工学部・神戸大学工学部との共同研究を開始した。今後はペプチドヘリガンドを付加して四重らせん構造との複合化が期待できる。次に、Undruggable な NRAS を狙う分子標的型がん光線力学療法の開発研究であるが、2018 年度の Nat. Commun. の成果を発展させる研究を進めている。活性酸素非依存型の切断機構を応用することで、腫瘍深部や活性酸素耐性がんに対する有効性を確認している[44]。また、東北大学医学部との共同研究により実験動物への投与方

法と薬効の評価方法を検討した。同時に、神戸大学工学部や徳島大学薬学部との共同研究により、デリバリーシステムの開発にも着手した。2021年になり、両者ともよいキャリアの開発にめどが付きつつある[45]。神戸医療産業都市機構や株式会社リバネスの助言を受けて実用化を目指している。また、脳腫瘍を標的とした分子標的型光線力学療法に必要な光増感剤の開発にも着手した。脳腫瘍内の RNA 四重らせん構造を狙った化合物のスクリーニングから有望なものを同定しつつある。

### 3-5) 無機構造体

無機構造体も、ペプチドとの複合により様々な応用が考えられる。このような無機構造体とペプチドとの複合体創製には無機構造体特異的なペプチド配列の付加による非共有結合や、SH 基を介する共有結合、アミド結合による共有結合による複合が考えられる。

まず、①ダイレクトプレーティング法による金属薄膜の合成研究であるが、本テーマでは、ポリイミド樹脂上へ電気絶縁性を有する光沢銀薄膜を形成することを目的とし、ダイレクトプレーティング法による薄膜形成について検討した。その結果、比較的温和な条件下で樹脂表面に析出する銀ナノ粒子のサイズ制御が可能であり、金属光沢を示しかつ電気絶縁性を有する金属薄膜の作製に成功した。この知見は、塗料に変わる光沢フィルムの作製が可能である事を示唆している[46, 47]。次に本島状薄膜材料の形成メカニズムのモデル化を行い、反応速度式を立案した。フィルム表面に銀ナノ粒子を形成すると、粒子がフィルム表面を被覆するため反応場が減少する。そのため、フィルムと溶液の界面の面積比率の時間変化を考慮した反応速度式を立案し、銀イオン濃度変化の実測データをフィッティングすることで反応速度定数を算出することができた[48]。さらに、②沈殿法による高機能熱電材料の創製においては、まず、 $\text{CoSb}_3$  の化学合成における大量合成手法の確立を目的とし、反応スケールを増大させた際の実験条件の最適化を試みた。その結果、数グラムスケールの粉末を得る条件は明らかとなったが、組成ばらつきが大きいことも明らかとなった。次に、 $\text{Bi-Te}$  系熱電材料の化学合成を行い、組成制御およびペレット化条件の最適化を試みた。その結果、1次粒子系および組成制御に成功し、従来技術で作成された材料の熱電特性に匹敵する性能の発現を確認した[49]。さらに高分解能 TEM 観察をおこなったところ、結晶子内に無数の欠陥とみられる得意なコントラストが確認された。アニール後の試料ではこのコントラストが消失したことから、シングルサイズの微結晶を出発原料として用いたことにより、アニール中の *in situ* 結晶成長の際に大量の欠陥が導入され、格子熱伝導率を減少させたと考えられる。現在、条件最適化と論文執筆を進めている。

### 3-6) 多孔性金属錯体(MOF)

多孔性金属錯体(MOF)のような有機-無機ハイブリッドについてもペプチドとの複合により様々な応用が考えられる。

①MOF 内での機能化金属ナノ粒子の合成研究[50]においては、まず、ポリピロールで機能化されたパラジウムナノ粒子の MOF 内合成に成功し、それがフェニルアセチレンの半水素化反応において高い選択性を示すことを明らかにした[51]。さらに得られた触媒を用いて種々の反応を行ってみたいところ、アルケンの水素化反応において高い触媒活性を示すことを明らかにした。次に、細孔内ではなく MOF 結晶表面上に PdNP を選択的に形成させる手法を開発することに成功した。形成メカ

ニズムについて詳細に調べた結果、MOFの外でPdNPが形成された後MOF結晶表面に集積することが明らかになった。これまでのMOF結晶表面上に金属ナノ粒子を集積させる研究例と比較して、本手法は非常に簡便でかつ大量合成も容易であることが大きな特徴であり、今後は得られた複合体の応用研究を行っていく予定である[52]。さらに、②MOFの構造変換反応を利用したゲスト分子の能動的放出研究については、近年見出したMOFの構造変換反応を利用することにより、水に応答してゲスト分子を能動的に放出できる新たなホストゲスト系の構築に成功した。サイズの異なるさまざまな芳香族ゲスト分子を用いてゲスト分子放出の実験を行ったところ、全ての系においてゲスト分子は放出された。また、構造変換後のMOFにもゲスト分子は内包されていたことから、構造変換反応に伴う細孔体積の減少により、内包しきれなくなったゲスト分子が放出されていることが明らかとなった。今後は薬剤となる分子などをゲスト分子として用いることで、応用展開を図る予定である[53]。また、③構造変換反応を用いた水分散性MOFの合成については、我々が近年見出したMOFの構造変換反応を利用することにより水に分散可能なMOFの合成に成功した。また、構造変換反応の条件を変えることで得られるMOF結晶のサイズおよび水分散性を制御可能であることも明らかとなった。MOFは近年バイオ関連分野での研究利用が盛んに行われているものの、MOF本来の疎水性がさらなる応用の妨げとなっている。今後は今回得られた水分散性MOFのバイオ関連分野での利用を目指した研究やさらに水分散性の高いMOFの開発を目指し研究を行っていく予定である。さらに、④疎水化処理を施したMOFを用いたMOF超構造体の構築では、まず、疎水性分子の後修飾による疎水性MOFの合成に成功した[54]。次に得られた疎水性MOFを用いたりキッドマーブルの形成とその性質評価についての研究をおこなった。十分な疎水性を有するMOFを用いることにより、りキッドマーブルの形成には成功したものの、得られた超構造体はりキッドマーブル内の水の蒸発に伴って崩壊することが明らかになった。また、りキッドマーブル内の水の蒸発速度にMOFが与える影響について評価したところ、興味深いことにMOFにより水の蒸発が促進されていることが明らかになった。水の蒸発を促進する物質は海水の淡水化などの応用において注目されており、今後はこの現象について詳細に解析するとともに、上記の応用に向けた研究も展開していきたいと考えている。また、水の蒸発に対しても安定なりキッドマーブルの合成を目指した研究も今後展開していく予定である[55]。これとは別に、多孔性金属錯体を用いた固体発光材料の合成も行い、ベンゼン系のゲスト分子が導入されることで発光示すことがわかっているMOFにビフェニル系の分子をゲストとして細孔内に導入することにより安定的な発光するMOF複合体の合成に成功した。

さらに、④金属イオンドープ高分子フィルム上でのMOF結晶成長過程研究も行っている。クラックやボイドの無いCP連続膜を形成するには、支持基板上での核形成および核成長速度を制御することは非常に重要と考えられる。そこでNH<sub>2</sub>-MIL-53(Al)をターゲットCPとし、高分子フィルムからの金属イオン溶出速度ならびに錯形成速度に大きく影響を及ぼすリガンド濃度を変化させ、成長過程解析を試みた。その結果、核形成速度が増大することで、反応初期段階に基板表面上に高密度に核が形成し、成長反応が抑制されることでキュービック状に近い結晶が得られることが分かった。一方、核形成速度を減少させるとロッド状の結晶が得られることが明らかとなった[56]。リガンドが金属イオン溶出速度と錯形成速度の独立制御することを目指し、アミン系リガンドで構築されるZIF-8をターゲットCPとし、金属イオン溶出速度を硝酸ナトリウムで制御することについても

検討した結果、この溶出反応がトリガーとなり基板表面上にCPが形成されることが分かった。ZIF-8 に関しては等方的な結晶形であるため結晶形状に変化は見られなかったが、反応初期の核形成速度が大きい場合には小さな結晶同士が融合した連続膜が得られ、反応初期の核形成速度が小さい場合には大きな結晶同士が融合した連続膜となることが明らかとなった[57]。次に、金属イオンドープ高分子フィルム上での柔軟な（構造転移能を有する）金属有機構造体（MOF）の直接合成とその構造転移の評価研究も行った。相互貫入型構造を有し、ゲスト分子の有無によって結晶構造が変化する[Cu<sub>2</sub>(bdc)<sub>2</sub>(bpy)]<sub>n</sub> (bdc = 1,4-benzencarboxylate, bpy = 4,4'-bipyridine)をターゲットとし、金属イオンドープ高分子フィルム上での直接合成およびその構造転移の評価を行った。界面合成法にて作製した MOF は基板のポリマーによって構造転移が変化し、改質条件に伴い構造転移能を調節できる可能性が示された[58]。また、⑤Au-thiolate 系 CP 薄膜の one-pot 合成法の開発においては、Au 塩として市販されている塩化金酸は水溶液中にて塩化金アニオンとして存在しているためこれまで使用してきたポリイミドフィルムではなく、ナイロンフィルムを用いて金イオンドープフィルムの作製ならびに Au-thiolate CP の作製を試みた。その結果、アモルファス状態の錯体の形成を経てファイバー状の Au CPs が形成されることが明らかとなった。このアモルファス-結晶間の相転移は Au イオンと thiophenolate の再配置によるものと考えられる[59]。また、Cu<sup>2+</sup>および Ag<sup>+</sup>と thiolate からなる CP の作製についても同様に検討を行い、金属イオンドープポリマーフィルム上にて選択的に形成可能であることが分かった。さらに、ポリイミドフィルムに対してフォトレジストを使用することによりパターン形成にも成功した[60, 61]。

#### 4) 細胞研究を中心としたバイオへの応用に向けた準備研究

さらに、様々な細胞研究へのペプチドの応用に向け、4-1) マクロファージ、4-2) ヒト皮膚線維芽細胞、4-3) がん細胞、4-4) 骨細胞についてそれぞれ研究を行った。

##### 4-1) マクロファージ

これまでに確立した、マクロファージの貪食能を迅速かつ正確に定量できる評価系を用いて、種々の因子による貪食活性化を評価したところ、血清に酵素処理を施した serum MAF が素早くかつ高率に活性化できることを明らかにした。また、serum MAF による活性化に伴って lipid raft が形成され、その後アクチン繊維の集積が起り、Frill-like 構造と名付けた複雑な膜の ruffling が生じることを発見した。そしてそれが貪食能の上昇に不可欠であることを示した[62]。次に、lipid raft 構造とアクチン繊維の再構成とを結び付ける因子の候補として、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質であり、同時に膜脂質やアクチンとも直接結合出来ることが知られている、annexin をターゲットとして解析を行った。その結果、serum MAF 刺激の伝達経路には Ca<sup>2+</sup>シグナルが関与することを示しており、遅くとも 30 秒以内に伝達されることが明らかとなった[63]。さらに、Ca<sup>2+</sup>シグナルの関与を検討した。EGTA や BAPTA-AM を用いて細胞外や細胞内の Ca<sup>2+</sup>をキレートしたところ、貪食能活性化の低下が見られた。Ca<sup>2+</sup>インジケータである Calblite を用いたタイムラプス Ca<sup>2+</sup>イメージングを行ったところ、細胞外 Ca<sup>2+</sup>が細胞内に流入することが serum MAF による貪食能活性化の最初のステップであると考えられた。ここではたらくチャネル様分子を同定すれば、新たな貪食能活性化メカニズムの全貌が明らかにできる段階に至ったということである[64]。マクロファージの活性化過程に関して、このような

素早い反応はこれまでに明らかにされておらず、自然免疫系を活性化する新たな経路の発見につながると期待される。

#### 4-2) ヒト皮膚線維芽細胞

ヒト皮膚線維芽細胞を用いた研究では、コラゲナーゼとして知られる MMP1 の転写が脂肪細胞の上清やマクロファージの上清によって大きく変化することを明らかにし、真皮細胞と他の組織との相互作用が皮膚の恒常性維持に重要であることを示すことができた。さらにヒト皮膚線維芽細胞や角化細胞に対するマクロファージからの分泌因子の影響を、チップ解析により行った。その結果、コラゲナーゼとして知られる MMP1 の転写が大きく変化するなど、これまでの知見を確認したほか、種々の遺伝子発現に変化をもたらしていた。さらに生体防御に重要な免疫細胞としてマクロファージに注目し、皮膚最外層の角化細胞との相互作用を明確に解析するため、角化細胞株の HaCaT にマクロファージの培養上清を添加する実験を行った。その結果、マクロファージの上清を添加された細胞では、基質や隣接する細胞との接着が強くなり、扁平化する細胞や、盛んに移動しながら細胞の一部を長く伸ばして細胞体の一部を切断するような細胞も見られた。その際の遺伝子発現の変化を調べると、形態観察で明らかになった特徴が遺伝子発現からも合理的に説明できることが明らかになった。これらの変化の生体内での意味はまだ不明だが、上皮化を促進できる細胞が自ら fibronectin を分泌しながらその上を移動して行くことは、創傷治癒を早めることに貢献することが期待される。

#### 4-3) がん細胞

がん細胞に関連する研究も行っている。新規核内アクチン線維構造の形成分子機構の解明においては、p53 の活性が低下した細胞を抗がん剤で処理すると、核内でアクチンの重合が促進し、ファイバー様の構造：核アクチンファイバーを形成することを見出してきた[65, 66]。p53 による核アクチンファイバー形成抑制の分子機構を調べたところ、抗がん剤処理によって活性化した p53 は、カスパーゼの活性化を介して、核アクチンファイバーの形成を抑制していることを示唆する結果が得られた。さらに、がん細胞における細胞融合メカニズムにおいても、アクチン線維は関与している。がん細胞の細胞融合は、がんの悪性化に寄与していると考えられているが、そのメカニズムについては知られていない。我々は単塩基ゲノム編集技術を用いてヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に変異を導入することで、恒常的に細胞融合するクローンを獲得した。全エクソーム解析により遺伝子配列を解読したところ、細胞融合クローンに特異的かつ他の融合クローンで共通している遺伝子変異を同定した。またアクチンの重合を阻害したところ、細胞融合が抑制されたことから、アクチン線維の再構築が細胞融合に重要であるということが分かった。がん細胞の細胞融合は、がんの悪性化に寄与していると考えられているが、そのメカニズムや形質変化についてはよくわかっていない。我々は単塩基ゲノム編集技術を用いてヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に変異を導入することで、恒常的に細胞融合するクローンを獲得した。全エクソーム解析により遺伝子配列を解読したところ、細胞融合クローンに特異的かつ他の融合クローンで共通して七回膜貫通型の嗅覚受容体である Olfactory receptor 1 N2 をコードする OR1N2 遺伝子変異を同定した。OR1N2 の変異体を親株である HeLa 細胞に導入したところ、細胞融合が促進され、ドキシソルビシンなどの抗がん剤に対して耐性

を示すようになったことから、がん細胞の細胞融合は薬剤耐性に寄与しているということが分かった。

抗がん剤処理による rDNA の四重らせん構造 (G4) 集合体の形成研究では、多くの抗がん剤は、核小体ストレスを誘導し、核小体周辺にキャップ様構造を形成させる。しかし、その意義は不明である。このキャップ様構造に rDNA が集積し、そこでは rDNA 内で形成する四重らせん構造 (G4) が集合体を形成することが分かった。また、抗がん剤を培地中から除去すると、rDNA-G4 集合体が崩壊とともに、キャップ様構造も崩壊し、がん細胞の増殖が再開することが明らかとなった。このことから、rDNA-G4 集合体は、抗がん剤でがん細胞が死滅しないようにする役割を果たしている可能性が推察された。多くの抗がん剤は、核小体ストレスを誘導し、核小体周辺にキャップ様構造：核小体キャップを形成させる。しかし、その形成機構および意義は不明である。まず、核小体キャップに rDNA が集積し、そこでは四重らせん構造 (G4) が形成していることを明らかにした。核小体キャップは液液相分離現象によって形成されるドロプレットであり、rDNA-G4 がこのドロプレット形成を誘導していることが分かった。また、核小体キャップの形成によって抗がん剤感受性が增强されることも示された。抗がん剤処理によって活性化されるがん抑制遺伝子産物 p53 は多くのがん細胞にてその機能が欠損している。p53 の欠損は NFκB の活性化を介して核小体キャップの維持が行えなくなっていることが分かった[67-69]。

#### 4-4)骨細胞

機械的負荷 (メカニカルストレス) が、骨の恒常性の維持に重要であることは、古くから知られている。しかしながら、その分子機構は長年不明であった。我々は、通常接着斑で機能を示す p130Cas 分子が核に分布し、炎症プロセスを促進する NF-κB 活性を緩和することが、メカニカルストレスによる骨の恒常性の維持に重要であることを明らかにした。本研究は、10 年越しのプロジェクトであり、その成果を米国科学雑誌 *Science Advances* で報告し、完遂することができた[70]。

#### 5) ペプチド複合体を用いた応用研究

##### 5-1) 酵素の機能向上研究

まずは、酵素 (タンパク質、ポリペプチド鎖) を題材に、機能向上 (酵素活性化) 研究を行った [71]。①酵素法によるバイオエタノール製造効率化に関する研究では、セルラーゼに含まれる酵素 (セロビオハイドロラーゼ I、II、エンドグルカナーゼ I~V、β-グルコシダーゼなど) の単離 (ただし、エンドグルカナーゼ I、III、IV、V は混合物として取得) に成功し、ベタイン型添加剤がこれらすべての酵素を活性化することを確認した。また、一般にセルラーゼにおけるこれら酵素を混合すると、セルロース分解に対して相乗効果が発現するが、ベタイン型添加剤を加えるとその相乗効果がさらに促進される場合があることが明らかとなった。また、稲わらやバガスのような原料基質の資化についても評価を行うことができ、ベタイン型添加剤に反応促進効果があることが確認された。実用化していくためには添加量の最適化やスケールアップ、従来の方法との進歩性などを検証していく必要があり、今後も検討を進めていく予定である [72]。②また、溶液中の酵素の安定性に及ぼす影響の研究では、ベタイン型添加剤による酵素活性化は、これまでの研究からベタイン型添

加剤の優先的水和が間接的に酵素の活性化を引き起こすものと考えられてきた。まず、蒸気圧測定、粘度・密度測定から水和が及ぼす影響を定量的に解析した。その結果、水溶性の低分子化合物についてはベタイン型添加剤との間に斥力が働くことが明らかとなり、これまでの仮説が支持される結果を得ることができた。また粘度・密度測定からベタイン型添加剤の水和と、バルク水の構造化に及ぼすパラメータを取得することに成功している。次にベタイン型添加剤の水和特性の理解を深めるために、類似した特性を持つスルホベタイン、アミン N-オキシド、テトラアルキルアンモニウム塩などでも同様のパラメータを取得した。その結果、同じような酵素活性化を引き起こしているが、密度変化、粘度変化、水和挙動などに違いがあることが明らかとなった。今後は分子動力学計算などを組み合わせてその違いがどのような化学現象を引き起こすか明らかにしていければと考えている。さらに、③ペーパーデバイス上の酵素の保存安定性の向上研究では、溶液中におけるベタイン型添加剤の働きについては明らかとできていたが、酵素の利用用途の一つである検査紙のようなペーパーデバイス上での安定化効果があるか否かについての検証は行われてこなかった。そこで濾紙上に酵素をベタイン型添加剤とともに共担持し、共担持したベタイン型添加剤が酵素に対して安定化効果を示すかどうか調べたところ、水溶液と類似した構造依存性、添加濃度依存性を持った安定化を示すことが明らかとなった。これは単独の酵素系においても発現するか、複数の酵素を担持した濾紙でも働くことが明らかとなった[73]（令和元年3月に出願済）。

## 5-2) 無機物複合体形成研究と材料応用

無機物との複合体形成研究とその応用研究も行っている。東京工業大学生命理工学院堤浩准教授との主たる共同研究テーマであり、本研究の中核を担っている、ミネラルゼーション（無機物沈殿）に関する研究である。まず、制御が難しい無機物沈殿の精密制御を行うことを目標に、電磁波照射による無機物沈殿の影響を詳細に調べる研究を行った。その結果、試料に一方向からの直線的な電磁波の照射や2方向からの電磁波照射によってさらに沈殿物の形状が変化することを見出し、現在論文投稿を行っている。また、無機物沈殿のより複雑な位置特異的制御のテーマにおいて、金とチタニアの複合体を、ペプチド-DNA複合体上に作製することが可能となった[74]。さらに、細胞内でのペプチドを用いた金の無機物沈殿にも成功し、こちらも論文発表を行っている[75]。本研究は今後、バイオ、医療分野への応用展開も期待できる。また、沈殿ペプチド配列の詳細解析も行って、論文発表も行った[76]。最終年度では、固定化ペプチドを用いた希少有用金属イオンの回収のテーマを主に進めている。具体的には、樹脂上に金還元ペプチドを配置して、金のみを樹脂上にナノ粒子として固定し、回収と材料創製を同時に試みる研究で、触媒活性を有する金ナノ粒子含有樹脂ビーズの作製が可能となっている[77]。本研究は材料分野への応用展開が期待でき、堤准教授との共同研究をさらに深化させ、共著での成果を今後は挙げていきたい。

## 5-3) 樹脂複合ペプチドによるアレルギー感作試験法の確立

ペプチド固定化樹脂を用いた新規のアレルギー感作試験法の構築を行った。DPRA（Direct Peptide Reactivity Assay）法で用いるペプチドを樹脂、磁性ビーズなどの固相担体に固定化し、さらにアミノ基指示薬、チオール基指示薬を使用することで、簡便かつ汎用性のある検出法を確立した[78, 79]。この研究の一部はRSCのAnalyst誌において中裏表紙にも採用され注目されている。簡便

かつ汎用性のある検出法が確立できたので、さらに短時間での測定や仮初速度を求めて速度論解析を試みた。ペプチドは固定化しているために本格的な速度論解析は難しいものの、ある程度の簡単な解析は可能であることが示唆され、現在論文執筆に向け、詰めの研究を行っている。さらに質量分析による測定や磁性ビーズを用いる測定も確立した[80]。物質のアレルギー感作試験は様々な分野への適用が必要とされており、化粧品分野はもちろん、食品分野、健康医療・医用工学分野でも注目が集まってきている。

#### その他の成果報告・特記事項：

本大学間連携共同研究先である東京工業大学生命理工学院堤浩准教授と研究代表者臼井が中心となり、2019年度に第3回ナノバイオ交流会を開催した。ペプチドに関する講演のほか学生によるポスター発表を行い、ナノからバイオまで幅広い研究の交流を図った。2020年度は新型コロナウイルス感染症の影響により、開催できなかったが、2021年度にも、堤浩准教授と研究代表者臼井が中心となり、第4回ナノバイオ交流会を開催した。オンラインと対面による講演のみでポスター発表は中止としたが、ペプチド関連の講演をメインに、ナノからバイオまで幅広い研究の講演を通して、交流を図った。

#### 参考資料：

[1] Usui K., Yokota S., Iwata K., Hamada Y.

Novel Purification Process for Amyloid Beta Peptide(1-40)

*Processes*, **8**, 464 (2020) ※表紙掲載

[2] 岩田和也、臼井健二

種々の短鎖ペプチドによる線維化配列探索に向けた予測システムの構築

日本化学会 生体機能関連化学部会若手の会 第32回サマースクール、オンライン 2021/07

[3] 藤井敏司

血液検査からアルツハイマー病の兆候を検出する電気化学センサの開発

JST 新技術説明会、Zoom Webinar 2022/03

[4] 平田桃、川内敬子、西方敬人、中西伸浩、臼井健二

マイクロ波照射による細胞への影響とその応用

*日本電磁波エネルギー応用学会論文誌*, **5**, 38 (2021)

[5] 臼井健二、梅谷智弘

総合研究所研究チーム研究 「生体への影響解析のための電磁波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動」

*甲南大学総合研究所叢書*, **142**, 29 (2021)

[6] Shimizu K., Mijiddorj B., Usami M., Mizoguchi I., Yoshida S., Akayama S., Hamada Y., Ohyama A., Usui K., Kawamura I., Kawano R.

De novo design of a nanopore for single-molecule detection that incorporates a beta-hairpin peptide

*Nature Nanotechnology*, **17**, 67 (2022)



- [7] Kohata K., Miyoshi D.  
RNA phase separation-mediated direction of molecular trafficking under conditions of molecular crowding  
*Biophysical. Reviews*, **12**, 669-676 (2020)
- [8] Miyoshi D.  
Liquid-liquid phase separation induced by specific interactions between G4 nucleic acids and RGG motif peptides  
第3回 LLPS 研究会、大阪（大阪大学蛋白質研究所）2019/09
- [9] 鶴田充生、取井猛流、杉本渉、川内敬子、三好大輔  
核酸の化学修飾と構造や相分離能の相関  
月刊「細胞」（ニューサイエンス社）, **53**, 910 (2021)
- [10] Nakano S., Yamashita H., Tanabe K., Sugimoto N.  
Bulky cations greatly increase the turnover of a native hammerhead ribozyme  
*RSC Advances*, **9**, 35820 (2019)
- [11] 中野修一  
細胞内分子環境が核酸の構造と機能に与える影響—モデル実験系を用いた解析  
新学術領域「分子夾雑の生命化学」第2回関東地区シンポジウム、東京都（東京大学） 2019/10
- [12] Nakano S., Yamashita H., Sugimoto N.  
Enhancement of the catalytic activity of hammerhead ribozymes by organic cations  
*ChemBioChem*, **22**, 2721 (2021)
- [13] Sakashita S., Endoh T., Okada A., Usui K.  
Construction of gene expression control system using photolabile PNA peptide binding to Guanine-rich DNA/RNA  
*Peptide Science 2019*, **2019**, 107 (2020)
- [14] 島田直昭、村嶋貴之  
複素環式 N-Oxide 構造をもつ新規蛍光化合物の物性評価  
第39回有機合成若手セミナー、大阪（大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス） 2019/8
- [15] 角谷寿美玲、村嶋貴之  
凝集誘起発光色素における細胞毒性評価  
第39回有機合成若手セミナー、大阪（大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス）2019/8
- [16] 喜來美咲、村嶋貴之  
N-Oxide 構造を持つ AIE 色素の合成及び物性評価  
日本化学会 第102 春季年会、オンライン 2022/03
- [17] Nishimura A., Fukuda S., Murashima T., Matsui J.  
Effects of center metals in the porphyrin moieties on the retention behaviors of molecularly imprinted polymers.  
*Chromatography*, **40**, Supplement 1, 54 (2019)
- [18] Nishimura M., Imai Y., Matsui J.  
Effects of time and place in molecular imprinting of nicotine with itaconic acid.  
*Chromatography*, **40**, Supplement 1, 55 (2019)

- [19] Maeda M., Matsui J.  
Comparison of derivatization method and synthesis of derivative-imprinted stationary phase for analysis of 5-aminolevulinic acid in fermented food.  
*Chromatography*, 40, Supplement 2, 37 (2019)
- [20] Fukuda S., Murashima T., Matsui J.  
Investigation of the molecular recognition mode of polyphenol-imprinted polymers bearing iron-porphyrin moieties.  
*Chromatography*, 40, Supplement 2, 38 (2019)
- [21] 川嶋詩乃、中岡美妃、寺尾和花、佐藤龍哉、井戸遥香、大西さくら、末永壺成、村嶋貴之、松井淳  
金属ポルフィリン残基をもつケルセチンインプリント高分子における分離モードの切替  
第 28 回クロマトグラフィーシンポジウム (CS28)、徳島大学、徳島 (オンライン) 2021/6
- [22] Ono K., Sanada Y., Kimura Y., Aoyama S., Ueda N., Katayama T., Nagahama K.  
A thin hydrogel barrier linked onto cell surface sialic acids through covalent bonds induces cancer cell death in vivo  
*Biomaterials Science*, **8**, 577 (2020)
- [23] Nagahama K., Sano Y., Inui M., Aoyama S., Katayama T., Ono K.  
Bioinspired cell nuclear nanotransporters generated by self-assembly of amphiphilic polysaccharide-amino acid derivatives conjugates  
*Advanced Biosystems*, **4**, 1900189 (2020)
- [24] Inui M., Hamada Y., Sejima N., Ueda N., Katayama T., Ono K., Nagahama K.  
Exportin-inspired artificial cell nuclear-exporting nanosystems  
*Nanoscale Advances*, **4**, 2637 (2022)
- [25] 長濱宏治、佐野由倫、乾充男  
インポーチンに倣った細胞核移行性ナノキャリアの設計  
第 50 回医用高分子シンポジウム、(オンライン) 2021/07
- [26] 小野公佳、長濱宏治  
scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発  
第 50 回医用高分子シンポジウム、(オンライン) 2021/07
- [27] Ono K., Sumiya M., Yoshinobu N., Dode T., Katayama T., Ueda N., Nagahama K.  
Angiogenesis promotion by combined administration of DFO and vein endothelial cells using injectable, biodegradable, nanocomposite hydrogel scaffolds  
*ACS Applied Bio Materials*, **5**, 471 (2022)
- [28] Ono K., Hashimoto H., Katayama T., Ueda N., Nagahama K.  
Injectable biocatalytic nanocomposite hydrogel factories for focal enzyme-prodrug cancer therapy  
*Biomacromolecules*, **22**, 4217 (2021)
- [29] Kimura Y., Aoyama S., Ueda N., Katayama T., Ono K., Nagahama K.  
Covalent cell-loading injectable hydrogel scaffold significantly promotes tissue regeneration in vivo compared

with a conventional physical cell-loading hydrogel scaffold

*Advanced Biology*, **5**, 2000106 (2021)

[30] Nagahama K., Aoyama S., Ueda N., Kimura Y., Katayama T., Ono K.

Biological tissue-inspired living self-healing hydrogels based on cadherin-mediated specific cell-cell adhesion

*ACS Macro Letters*, **10**, 1073 (2021)

[31] Kodama A., Nakagawa A., Nonoguchi Y., Sakurai H., Yano C., Suzuki T., Koumoto K.

Solubilization of poorly water-soluble bioactive molecules in neutral aqueous media by complexation with renatured  $\beta$ -1,3-1,6-glucan nanoparticles

*Biopolymers*, **111**, e23349 (2020)

[32] Nonoguchi Y., Kodama A., Suzuki T., Koumoto K.

Modification of the release rate of curcumin from the cavity of renatured  $\beta$ -1,3-1,6-glucan nanoparticles by changing the molecular weight of the constituent polysaccharide chains

*Chemistry Letters*, **49**, 1150 (2020)

[33] Hino S., Funada R., Sugikawa K., Koumoto K., Suzuki T., Nagasaki T., Ikeda A.

Turn-on fluorescence and photodynamic activity of  $\beta$ -(1,3-1,6)-D-glucan-complexed with porphyrin derivative inside HeLa cells

*Photochem & Photobiol Sciences*, **18**, 2854 (2019)

[34] Hino S., Satake S., Shinmori H., Kawabata S., Koumoto K., Suzuki T., Nagasaki T., Sugikawa K., Kawasaki R., Ikeda A.

Improved stability and photodynamic activity of water-soluble 5,15-diazaporphyrins incorporated in  $\beta$ -(1,3-1,6)-D-glucan with on-off switch

*Chemistry – An Asian Journal*, **15**, 365 (2020)

[35] Hino S., Funada R., Sugikawa K., Kawasaki R., Koumoto K., Suzuki T., Nagasaki T., Ikeda A.

Mechanism toward turn-on of polysaccharide-porphyrin complexes for fluorescence probes and photosensitizers in photodynamic therapy in living cells

*ChemMedChem*, **16**, 793 (2020)

[36] Shimo T., Tachibana K., Kawawaki Y., Watahiki Y., Ishigaki T., Nakatsuji Y., Hara T., Kawakami J., Obika S.

Enhancement of exon skipping activity by reduction in the secondary structure content of LNA-based splice-switching oligonucleotides

*Chemical Communications.*, **55**, 6850 (2019)

[37] Takagi-Sato M., Morita K., Onishi Y., Watahiki Y., Ishigaki T., Akita T., Tomita E., Kawakami J., Koizumi M.

An improved synthesis of 2'-O,4'-C-ethylene nucleic acid (ENA) and thermodynamic studies of duplex formation containing the guanosine ENA unit

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **39**, 838 (2020)

[38] 秋田智香、川上純司

核酸医薬の化学 総論-修飾核酸と機能評価

実験医学, **39**, 2716 (2021)

[39] Watahiki Y., Kiyose A., Takemoto M., Ishigaki T., Taniguchi S., Akamatsu Y., Kawakami J.  
Construction of binding affinity dependent fluorescence aptasensors

The 46th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Tokyo 2019/10

[40] Watahiki Y., Kiyose A., Takemoto M., Ishigaki T., Taniguchi S., Akamatsu Y., Kawakami J.  
Construction of binding affinity dependent fluorescence aptasensor

*Proc. 46th Intl. Symp. Nucleic Acid Chemistry*, 354 (2019)

[41] Nakano S., Ayusawa T., Tanino Y., Sugimoto N.

Stabilization of DNA loop structures by large cations

*Journal of Physical Chemistry B*, **123**, 7687 (2019)

[42] 中野修一

核酸医薬の配列設計のための *in vitro* 評価：細胞内物質との弱い相互作用の影響

*BIO Clinica*, **12**, 82 (2021)

[43] 橋本佳樹、今川佳樹、杉本直己、三好大輔

グアニン四重らせん構造選択的リガンド開発における新規スクリーニングシステムの構築

第 14 回バイオ関連化学シンポジウム、福岡県（九州大学、オンライン） 2020/09

[44] 三好大輔

核酸四重らせん構造リガンドを用いた分子標的型光線力学療法

構造活性相関フォーラム 2019（日本薬学会構造活性相関部会）、東京（日本薬学会長井記念館 長井記念ホール） 2019/06

[45] Torii T., Sugimoto W., Kawauchi K., Miyoshi D.

Novel strategy of photodynamic therapy targeting RAS mRNA with G-quadruplex ligands for cancer treatment

*Journal of Data. Mining Genomics Proteomics*, **11**, No:1000226 (2020).

[46] 赤松謙祐、高嶋洋平、鶴岡孝章

化学的表面処理によるポリイミド樹脂のダイレクトメタライゼーション

*表面技術*, **70**, 182 (2019)

[47] 赤松謙祐

樹脂内イオン輸送を利用したダイレクトプレーティング

表面技術協会めっき部会例会 2019/07

[48] 赤松謙祐

電気化学リソグラフィを用いた樹脂のダイレクトパターニング

電気鍍金研究会例会「次世代を見据えた表面処理技術」、オンライン 2020/11

[49] Akamatsu K., Nakano S., Kimura K., Takashima Y., Tsuruoka T., Nawafune H., Sato Y., Murai J., Yanagimono H.

Controlling interfacial ion-transport kinetics using polyelectrolyte membranes for additive- and effluent-free, high-performance electrodeposition

*ACS applied materials and interfaces*, **13**, 13896 (2021)

- [50] Takashima Y., Sato Y., Tsuruoka T., Akamatsu K.  
Controlled syntheses of Ag nanoparticles inside MOFs by using amine-borans as vapour phase reductants  
*Dalton transactions*, **49**, 17169 (2020)
- [51] Takashima Y., Sato Y., Kubo N., Tsuruoka T., Akamatsu K.  
Precisely controlled reproducible synthesis of palladium nanoparticles inside metal-organic frameworks with H<sub>2</sub> gas as reductant: Effects of framework crystallinity and H<sub>2</sub> gas pressure  
*Chemistry Letters*, **50**, 244 (2021)
- [52] 高嶋洋平  
金属ナノ粒子—MOF 複合体の新規合成法の開発  
日本化学会第 102 春季年会、オンライン (2022) 2022/03
- [53] Takashima Y.  
Immobilization of functional molecules in porous coordination polymer by ion-exchange reactions  
China-Japan Symposium of Functional Coordination Chemistry 2019  
Sun Yat-Sen University, Guangzhou(China) 2019/04
- [54] 高嶋洋平  
後修飾法を利用した機能性 MOF の簡便合成  
技術情報協会セミナー No. 909411 (MOF の合成と吸着・分離材料への応用)、東京 (日幸五反田ビル) 2019/09
- [55] 久保音生、高嶋洋平、鶴岡孝章、赤松謙祐  
疎水化処理を施した MOF を用いた MOF 超構造体の構築  
日本化学会第 101 春季年会、オンライン 2021/03
- [56] Tsuruoka T., Hata M., Hirao S., Ohhashi T., Takashima Y., Akamatsu K.  
Formation of Metal-Organic Frameworks on Metal Ion-Doped Polymer Substrate: In-Depth Time-Course Analysis using Scanning Electron Microscopy  
*Langmuir*, **35**, 10390 (2019)
- [57] Ohhashi T., Tsuruoka T., Takashima Y., Akamatsu K.  
Control of the nucleation and growth processes of metal-organic frameworks using a metal ion-doped polymer substrate for the construction of continuous films  
*CrystEngComm*, **21**, 4851 (2019)
- [58] Hirao S., Hamagami R., Ohhashi T., Eguchi K., Kubo N., Takashima Y., Akamatsu K., Tsuruoka T.  
Exploration of structural transition phenomenon in flexible metal-organic framework formed on polymer substrate  
*CrystEngComm*, **23**, 8498 (2021)
- [59] Tsuruoka T., Ohhashi T., Watanabe J., Yamada R., Hirao S., Takashima Y., Demessence A., Vaidya S., Veselska O., Fateeva A., Akamatsu K.  
Coordination-driven self-assembly on polymer surface for efficient synthesis of [Au(SPh)]<sub>n</sub> coordination polymer-based films  
*Crystal Growth & Design*, **20**, 1961 (2020)

- [60] Vaidya S., Veselska O., Zhadan A., Daniel M., Ledoux G., Fateeva A., Tsuruoka T., Demessence A. Flexible and luminescent fibers of a 1D Au(i)-thiophenolate coordination polymer and formation of gold nanoparticle-based composite materials for SERS  
*Journal of Materials Chemistry C*, **8**, 8018 (2020)
- [61] Tsuruoka T., Miyashita Y., Yoshino R., Fukuoka M., Hirao S., Takashima Y., Demessence A., Akamatsu K. Rational and site-selective formation of coordination polymer consisting of d10 coinage metal ions with thiolate ligands using metal ion-doped polymer substrate  
*RSC advances*, **12**, 3716 (2021)
- [62] Kawakatsu K., Ishikawa M., Mashiba R., Tran N. K., Akamatsu M., Nishikata T. Characteristic morphological changes and rapid actin accumulation in serum-MAF-treated macrophages  
*Anticancer Research*, **39**, 4533-4537 (2019)
- [63] Akamatsu M., Mashiba R., Kawakatsu K., Ishikawa M., Nishikata T. Comparison of macrophage activation using  $\gamma$ -globulin and serum-derived macrophage activating factor  
*Anticancer Research*, **40**, 4707-4710 (2020)
- [64] Kawakatsu K., Seta Y., Maemura M., Nishikata T. Involvement of annexin A2 in serum-MAF dependent phagocytic activation of macrophages  
*Anticancer Research*, **41**, 4089-4092 (2021)
- [65] Itoh K., Ebata T., Hirata H., Torii T., Sugimoto W., Onodera K., Nakajima W., Uehara I., Okuzaki D., Yamauchi S., Budirahardja Y., Nishikata T., Tanaka N., Kawauchi K. DMPK is a new candidate mediator of tumor suppressor p53-dependent cell death  
*Molecules*, **24**, 3175 (2019)
- [66] Sugimoto W., Itoh K., Hirata H., Abe Y., Torii T., Mitsui Y., Budirahardja Y., Tanaka N., Kawauchi K. MMP24 as a target of YAP is a potential prognostic factor in cancer patients.  
*Bioengineering*, **7**, 18 (2020)
- [67] Kawauchi K., Sugimoto W., Miyoshi D. The RAS mRNA G-quadruplex:making undruggable cancer targets druggable  
*ATLAS of Science* (2019/10)
- [68] Torii T., Sugimoto W., Kawauchi K., Miyoshi D. Novel strategy of photodynamic therapy targeting RAS mRNA with G-quadruplex ligands for cancer treatment  
*Journal of Data Mining in Genomics and Proteomics*, **11**,1000226 (2020)
- [69] Sugimoto W., Kinoshita N., Nakata M., Ohyama T., Tateisi-Karimata H., Nishikata T., Sugimoto N., Miyoshi D., Kawauchi K. Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure competition of a GC rich exon region in the TMPRESS2 gene  
*Chemical Communications*, **58**, 48-51 (2022)
- [70] Miyazaki T., Zhao Z., Ichihara Y., Yoshino D., Imamura T., Sawada K., Hayano S., Kamioka H., Mori S., Hirata H., Araki K., Kawauchi K., Shigemoto K., Tanaka S., Bonewald L. F., Honda H., Shinohara M., Nagao M., Ogata T., Haradas I., Sawada Y.

Mechanical regulation of bone homeostasis through p130Cas-mediated alleviation of NF- $\kappa$ B activity  
*Science Advances*, **5**, eaau7802 (2019)

[71] 青木拓真、山本真史、北村武大、森田祐子、甲元一也

酵素担持ペーパーデバイスにおいてベタイン誘導体が担持酵素の保存安定性に及ぼす影響

日本農芸化学会 2020 年度大会、福岡（九州大学） 2020/03

[72] 三宅子龍、甲元一也

ベタイン型添加剤によるセルラーゼの活性化 ～単離酵素と混合した複数の酵素に与える活性化効果～

日本農芸化学会 2021 年度大会、オンライン 2021/03

[73] 青木拓真、山本真史、北村武大、森田祐子、甲元一也

ベタイン型添加剤の共担持による酵素担持検査紙の保存安定性の向上

日本農芸化学会 2021 年度大会、オンライン 2021/03

[74] Ozaki M., Imai T., Tsuruoka T., Sakashita S., Tomizaki K., Usui K.

Elemental composition control of gold-titania nanocomposites by site-specific mineralization using artificial peptides and DNA

*Communications Chemistry*, **4**, 1 (2021)

[75] Ozaki M., Yoshida S., Tsuruoka T., Usui K.

Intracellular mineralization of gold nanoparticles using gold iron-binding peptides with cell-penetrating ability

*Chemical Communications*, **57**, 725 (2021) ※裏表紙掲載

[76] Ozaki M., Yoshida S., Oura M., Tsuruoka T., Usui K.

Effect of tryptophan residues on gold mineralization by a gold reducing peptide

*RSC Advances*, **10**, 40461 (2020)

[77] Yoshida S., Tsuruoka T., Usui K.

Synthesis of immobilized gold nanoparticles with catalytic activity using resin conjugated with gold mineralizing peptide

*Peptide Science 2021*, 133-134 (2022).

[78] Miyazaki H., Takaishi H., Ikeda H., Ariumi H., Hamada Y., Yamashita K., Usui K.

Synthesis of peptide-immobilized magnetic beads, and peptide reactivity assay for assessing skin sensitization utilizing chromophore

*Processes*, **8**, 1257 (2020)

[79] Miyazaki H., Hamada Y., Takaishi H., Minamino Y., Ikeda H., Mekata H., Takaishi M., Yamashita K., Usui K.

Development of a chromophore-solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for assessing skin sensitization in vitro

*Analyst*, **145**, 3211 (2020)

[80] Miyazaki H., Samejima Y., Iwata K., Minamino Y., Hikida S., Ariumi H., Ikeda H., Hamada Y., Yamashita K., Usui K.

Mass spectrometry-based solid phase peptide reaction assay for detecting allergenicity using an immobilized

peptide-conjugating photo-cleavable linker

*International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 8332 (2020)